# 評価報告書

# 皮膚感作性試験代替法

# 改定 Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

令和 7 年 8 月 8 日

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

委員長　福山朋季（麻布大学）
委員　大竹利幸（株式会社資生堂）
笠原利彦（富士フイルム株式会社）
河上強志（国立医薬品食品衛生研究所）
小島肇（山口東京理科大学/国立医薬品食品衛生研究所）
瀬崎拓人（三井化学株式会社）
武吉正博（一般財団法人化学物質評価研究機構）
小島幸一（一般財団法人食品薬品安全センター）

**添付資料**

1）OECD (2025), Test Guideline No. 442E *In Vitro* Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation

**略語**

| | |
|---|---|
| DAPI: | 4',6-Diamidino-2-phenylindole |
| GAPDH: | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GHS: | Globally Harmonized System |
| h-CLAT: | Human Cell Line Activation Test |
| IL-8 Luc assay: | Interleukin-8 Reporter Gene Assay |
| LLNA: | Local Lymph Node Assay |
| OECD: | Organisation for Economic Co-operation and Development |
| PI: | Propidium iodide |
| TG: | Test Guideline |
| U-SENS™: | U937 Cell Line Activation Test |

## １．改定の目的

Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay) を含む経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) 試験法ガイドライン (Test Guideline :TG）442E の改定は、2025 年 6 月に公開された [1]。本試験法の基準変更は、原案における非感作性が疑われる化学物質中の判定不能物質数を減らすため実施された。

## ２．試験方法の変更点の概要

改定前のガイドラインでは、非感作性が疑われる化学物質について 20 mg/mL で X-VIVO™ (ロンザ社) に不溶の場合、全ての化学物質が判定不能と判断されてしまった。本改定では表 1 に示す Inh-GAPLA が 0.8 という基準を新たに設定することで、従来の判定不能化学物質の中から陰性物質を判定できるようにしている [1]。

本改定に際し、ほとんどの細胞で普遍的に発現するハウスキーピングタンパク質である Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のルシフェラーゼ活性 (GAPLA) を測定し、化学物質処理した細胞の GAPLA を無処理の細胞の GAPLA で割った Inh-GAPLA という新たな評価項目を追加している（表１）。Ind-IL8LA が感作性の有無を評価するのに対して、Inh-GAPLA は細胞毒性の程度を判断する指標として用いられている。Inh-GAPLA のカットオフ値を求めるため、Human Cell Line Activation test (h-CLAT) や U937 Cell Line Activation Test (U-SENS™) で細胞毒性の指標として用いられているフローサイトメトリー法による propidium iodide (PI) 染色で細胞の染色性結果との比較を行った。その結果、Inh-GAPLA が 0.8 以上の場合は正確な染色性が維持されたのに対して、図 1～3 に示すように、Inh-GAPLA が 0.8 を下回る場合には、濃度および時間依存的に PI reduction が低下した (143 被験物質の Inh-GAPLA データからカットオフ値として 0.8 を設定) [2,3]。以上の結果から、「Inh-GAPLA の基準 0.8」が細胞毒性の指標の妥当性を担保できる基準として本改定では採用されている。

しかし、Inh-GAPLA ではなく、他の樹状細胞を対象とした皮膚感作性試験代替法と同様に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) や PI 染色を用いたフローサイトメトリー法による PI reduction value (もしくは細胞生存率) の方が、細胞数を直接測定できることから、これらを指標とするべきとも考えられる。本委員会では、「Inh-GAPLA の基準 0.8」については今後も慎重な議論が必要であると判断した。

表１．IL-8 Luc assay のパラメーターの定義

| パラメーター | 定義 |
|---|---|
| GAPLA | SLR luciferase activity driven by GAPDH promoter |
| IL8LA | SLO luciferase activity driven by IL-8 promoter |
| nIL8LA | IL8LA/GAPLA |
| Ind-IL8LA | nIL8LA of THP-G8 cells treated with chemicals / nIL8LA of untreated cells |
| Inh-GAPLA | GAPLA of THP-G8 cells treated with chemicals / GAPLA of untreated cells |
| PI reduction | % of PI-excluding cells among THP-G8 cells treated with chemicals / % of PI-excluding cells among THP-G8 cells without chemical treatment. |

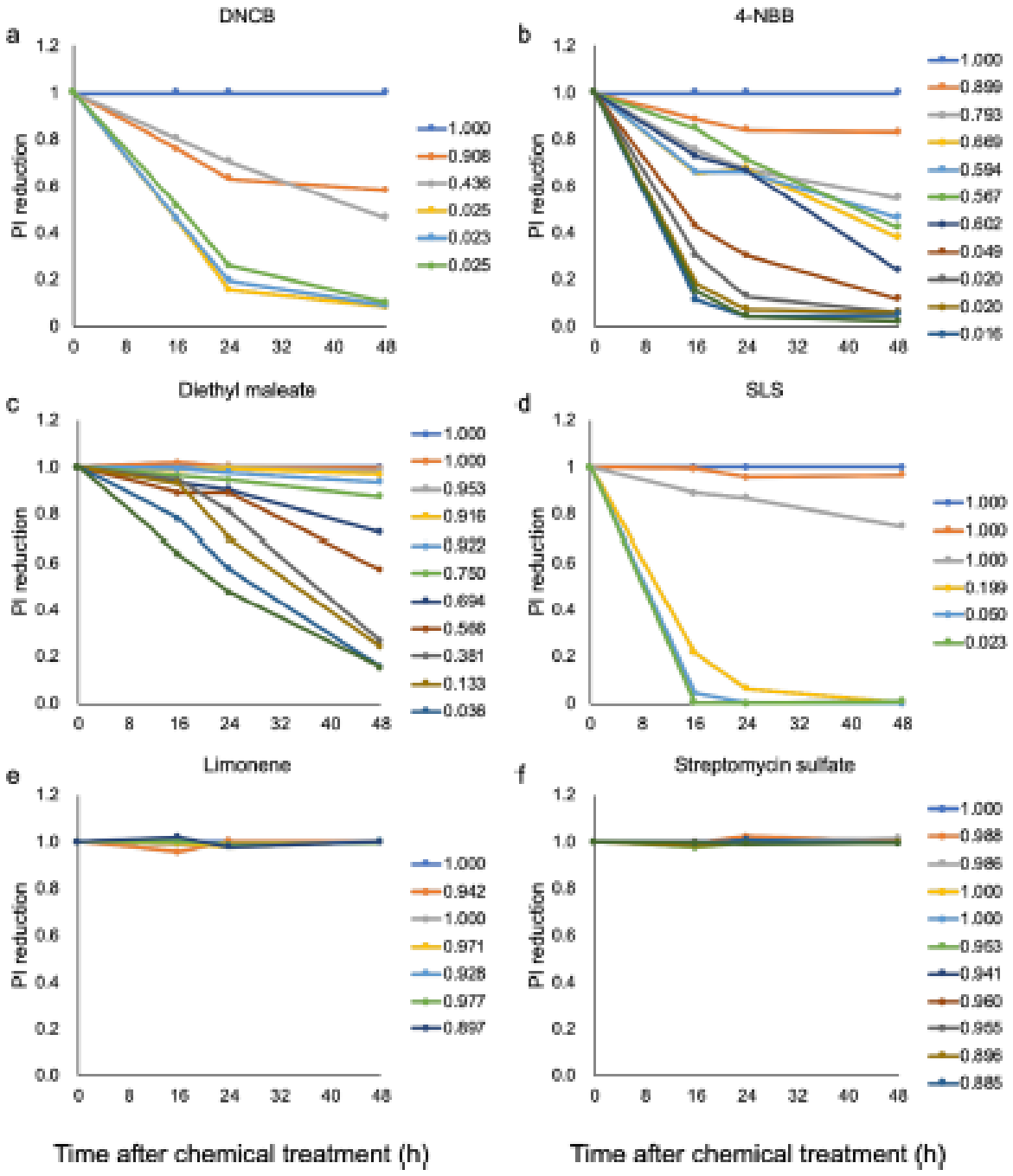



図 1.　化学物質で処理された THP-G8 細胞における PI 低下は、Inh-GAPLA のレベルが下がり、培養期間が長くなるにつれて減少

THP-G8 細胞は、4 種類の感作性物質である DNCB、4-NBB、ジエチルマレイン酸、リモネン、および 2 種類の非感作性物質である SLS とストレプトマイシン硫酸塩のさまざまな濃度で処理され、16 時間後の Inh-GAPLA および化学物質処理後 16、24、48 時間での PI を排除している細胞数が調べられた。THP-G8 細胞は、Inh-GAPLA の値が 0.02 から 1.0 の範囲で分布する濃度 (mg/mL) の化学物質で刺激された。各濃度の化学物質で処理した THP-G8 細胞の PI 低下は、0 時間、16 時間、24 時間、48 時間で示

されている。各線には、PI 低下が測定された化学物質の濃度で処理された THP-G8 細胞の Inh-GAPLA 値が付されている。

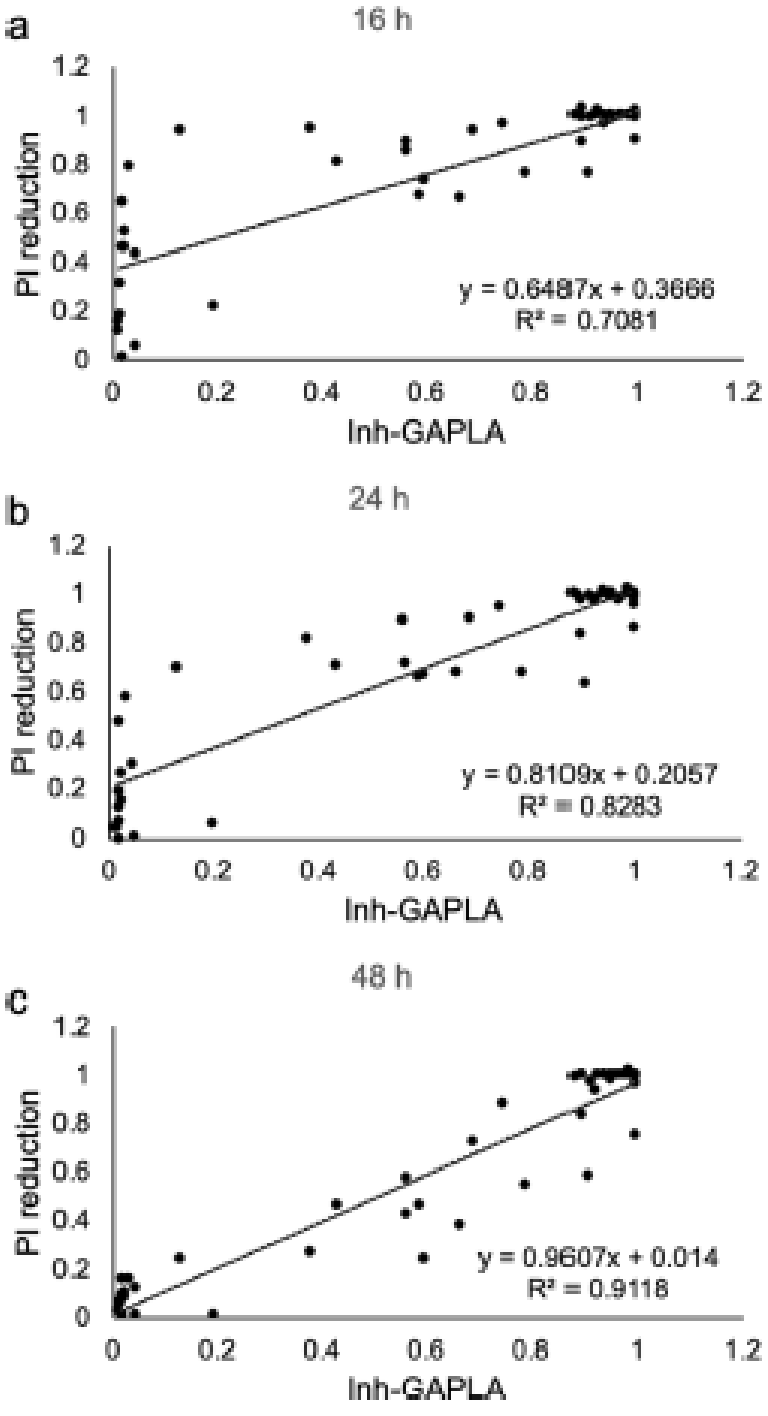



図２． Inh-GAPLA および PI 減少の直線関係

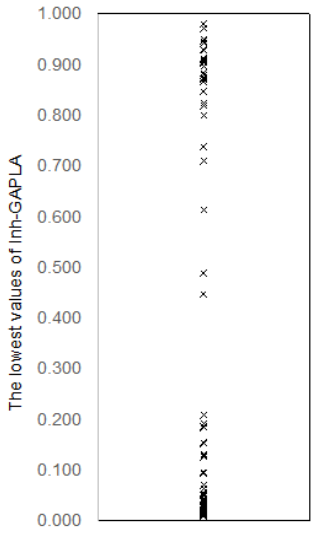



図３． IL-8 Luc assay 原法により実施された化学物質の Inh-GAPLA の最低値の分布 (n = 143)

３．判定基準

図４に示すように、旧予測モデルに「Inh-GAPLA の基準 0.8」を加えることにより、判定不能を減らすことを目指すフローチャートとなった。旧予測モデルは、化学物質が非感作性と仮定された場合、20 mg/mL で X-VIVO™ に溶解する場合は、そのまま陰性 (Negative) と判定されるが、20 mg/mL で不溶な場合は、十分な化学物質の曝露ができていないと考えられるので、判定不能 (Inconclusive) と判断される。一方、改定された予測モデルは、化学物質が非感作性と仮定された場合、20 mg/mL で X-VIVO™ に溶解する場合は、そのまま陰性と判定され変更はないが、20 mg/mL で不溶な場合は、細胞毒性の指標である Inh-GAPLA の値で下記のように２つに判別できる。Inh-GAPLA が、0.8 未満の場合は、細胞毒性が認められ、化学物質の曝露が十分であると考えられるので陰性と判定されるが、Inh-GAPLA が、0.8 以上の場合は、細胞毒性がなく十分な化学物質が曝露されているか不明なので、判定不能と判断される。

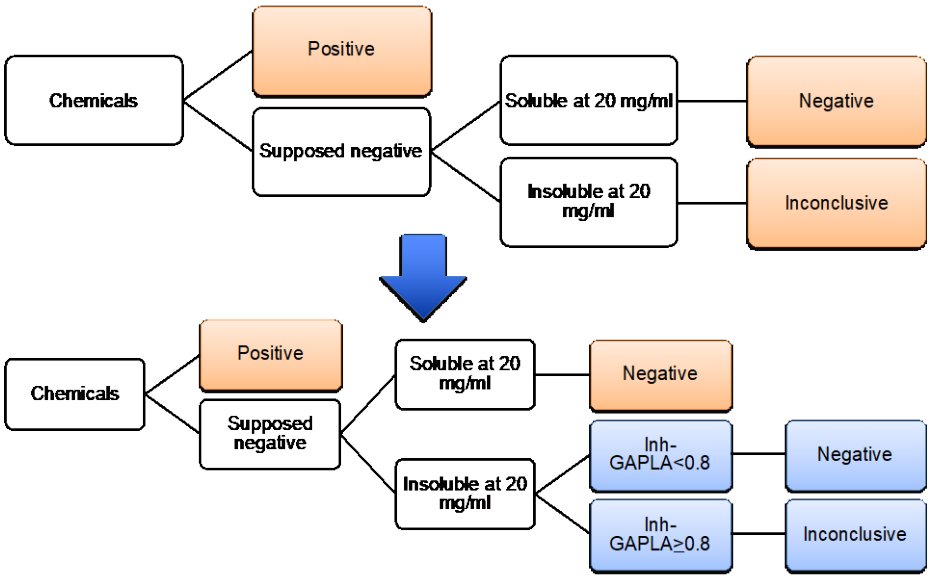



図４． 予測モデルの変更

原案

- 非感作性が疑われる化学物質⇒ 20 mg/mL で X-VIVO™ に溶解
  ⇒陰性
- 非感作性が疑われる化学物質⇒ 20 mg/mL で X-VIVO™ に不溶
  ⇒全て判定不能

改定案

- 非感作性が疑われる化学物質⇒ 20 mg/mL で X-VIVO™ に溶解
  ⇒陰性
- 非感作性が疑われる化学物質⇒ 20 mg/mL で X-VIVO™ に不溶
  ⇒Inh-GAPLA が 0.8 未満の場合は陰性、0.8 以上の場合は判定不能

４．予測性の改善

マウスを用いる局所リンパ節試験 (Local Lymph Node Assay : LLNA) に対する新旧試験法の予測性を表 2 に示す。予測モデルの改善により、新試験法では判定不能が 23 物質から 13 物質に減少した。新たに 10 物質が評価可能となったことにより陰性物質が 8 物質増え、偽陰性物質が 2 物質増えた。その結果、新試験法の感度は 95.8%から 93.9%に減少し、特異度は 52.9%から 68.0%に増加した。また、バランス精度[1]が 74.4%から 81.0%に増加した。

表２．LLNA に対する新旧試験法の予測性

| | IL-8 Luc assay 原法 | 改定 IL-8 Luc assay |
|---|---|---|
| 陽性 | 92 | 92 |
| 偽陰性 | 4 | 6 |
| 陰性 | 9 | 17 |
| 偽陽性 | 8 | 8 |
| 判定不能 | 23 | 13 |
| 適用範囲外 | 7 | 7 |
| 感度（%） | 95.8 (92/96) | 93.9 (92/98) |
| 特異度（%） | 52.9 (9/17) | 68 (17/25) |
| 正確度（%） | 89.3 (101/113) | 88.6 (109/123) |
| バランス精度（%） | 74.4 | 81 |

ヒト皮膚感作性に対する新旧試験法の予測性を表 3 に示す。予測モデルの改善により、新試験法では判定不能が 13 物質から 6 物質に減少した。新たに 7 物質が評価可能となったことにより、陰性物質が 5 物質増え、偽陰性物質が 2 物質増えた。その結果、新試験法の感度は 92.9%から 89.7%に減少し、特異度

[1] バランス精度：分類モデルの性能評価の一つの指標。バランス精度は、感度と特異度の算術平均として計算される。(JaCVAM 用語集より)

は 46.7%から 60.0%に増加した。また、バランス精度は 69.8%から 74.8%に増加した。

表３．ヒト感作性に対する新旧試験法の予測性

| | IL-8 Luc assay 原法 | 改定 IL-8 Luc assay |
|---|---|---|
| 陽性 | 52 | 52 |
| 偽陰性 | 4 | 6 |
| 陰性 | 7 | 12 |
| 偽陽性 | 8 | 8 |
| 判定不能 | 13 | 6 |
| 適用範囲外 | 6 | 6 |
| 感度（%） | 92.9 (52/56) | 89.7 (52/58) |
| 特異度（%） | 46.7 (7/15) | 60 (12/20) |
| 正確度（%） | 83.1 (59/171) | 82.1 (64/78) |
| バランス精度（%） | 69.8 | 74.8 |

LLNA との比較において表 4 に示す 2-nitro-1,4-phenylendiamine (Globally Harmonized System：GHS Cat.1A) および benzocaine (GHS Cat.1B) が判定不能から偽陰性となり、偽陰性物質数が４から６に増えた。これらのうち、2-nitro-1,4-phenylendiamine は GHS Cat.1A であるが、この物質はプレ/プロハプテンとされている。この結果は旧予測モデルにおいてプレハプテン (酸化により活性化される物質) やプロハプテン (P450 等による代謝活性化を必要とする物質) に関しては、多くが正しく判定された (プレハプテン 11/11、プロハプテン 6/6、およびプレ/プロハプテン 6/8) ものの、本細胞の代謝能は限定的であるため、一部のプロハプテンやプレハプテンについては偽陰性を生じる可能性があることを示している。従って、プロハプテンやプレハプテンの可能性がある化合物の陰性結果の解釈は慎重に扱うべきである。

ただし、表 5 に示すように、２-nitro-1,4-phenylendiamine は、THP-G8 細胞の親細胞である THP-1 を使用するｈ-CLAT を含め、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) および KeratinoSens™ でも正しく陽性の結果が出ている。本物質の偽陰性は細胞内代謝の影響というよりも予測モデルの違い等の別要因によるのではないかと考える。

なお、benzocaine (GHS Cat.1B) が判定不能から偽陰性となった。表 3 に示す他の 4 物質も合わせ、GHS Cat.1B の偽陰性物質に関しても今後、慎重な解析が必要と考えている。

表 4. 新旧で判定が変わった物質リスト

| 物質名 | CAS.No. | IL-8 Luc assay 原法 | 改定 IL-8 Luc assay | GHS 分類 |
|---|---|---|---|---|
| 2-Nitro-1,4-phenyelediamine | 5307-14-2 | 判定不能 | 陰性 | 1A |
| Benzocaine | 94-09-7 | 判定不能 | 陰性 | 1B |
| 1-Bromobutane | 109-65-9 | 判定不能 | 陰性 | なし |
| 4-Hydroxybenzoic acid | 99-96-7 | 判定不能 | 陰性 | なし |
| Acetoanisole (4-methoxyacetophenone) | 100-06-1 | 判定不能 | 陰性 | なし |
| Benzoic acid | 65-85-0 | 判定不能 | 陰性 | なし |
| Ethyl benzolecetate | 94-02-0 | 判定不能 | 陰性 | なし |
| p-Aminobenzoic acid | 150-13-0 | 判定不能 | 陰性 | なし |
| Salicylic acid | 69-72-7 | 判定不能 | 陰性 | なし |
| Sulfanilamide | 63-74-1 | 判定不能 | 陰性 | なし |

表 5. 2-Nitro-1,4-phenylendiamine の皮膚感作性試験の結果

| | | 試験名 | | | 動物実験結果 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 物質名 | CAS.No | DRPA | h-CLAT | KeratinoSens™ | LLNA | GHS 分類 |
| 2-Nitro-1,4-phenylenediamine | 5307-14-2 | 陽性 | 陽性 | 陽性 | 陽性 | 1A |

## ５．結論

本改定 (Inh-GAPLA が 0.8 という新基準の追加) により、IL-8 Luc assay の特異度が増加し、原案では判定不能と判断されていた化学物質の一部の判定が可能となった。一方で、感度と正確度は原案と比較すると若干減少する結果となったが、他の皮膚感作性代替法と比較すると依然として高い感度を維持できている。また、IL-8 Luc assay を他の皮膚感作性試験代替法と組み合わせて OECD GL497：ディファインド アプローチ (Defined Approach) で評価する場合、判定不能物質の減少と特異度の上昇が認められた[4]。本改定に伴い、IL-8 Luc assay は各感作性試験代替法と組み合わせて利用するに十分に適した方法であると考えられる。

一方で、細胞毒性の指標として本法では GAPDH のルシフェラーゼ活性を採用しているが、他の樹状細胞を対象とした皮膚感作性試験代替法と同様にフローサイトメトリー法を用いた DAPI や PI の取り込みを指標とするべきとも考えられた。また、プレ/プロハプテンにあたる GHS Cat.1A の物質が偽陰性と評価されている点も依然として本法の懸念事項として考えられた。本委員会は、上記の本試験法の様々な限界を勘案すると、本試験法単独での皮膚感作性の判定は不十分であると考える。証拠の重み付けや他の試験法との組み合わせでの利用を推奨する。

参考文献

１）OECD (2025), Test Guideline No. 442E *In Vitro* Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation

２）OECD (2023), Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO(2017)19/REV1/en/pdf)

３）Kimura, Y., Fujimura C. and Aiba, S. (2021) The modified IL-8 Luc assay, an in vitro skin sensitisation test, can significantly improve the false-negative judgment of lipophilic sensitizers with logKow values > 3.5 Archives of Toxicology 95(3):1-10, DOI:10.1007/s00204-020-02934-9

４）OECD (2025) OECD Guideline No. 497. Defined Approaches on Skin Sentitisation. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)